

539, 463

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
15. Juli 2004 (15.07.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/059305 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2003/004259

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Dezember 2003 (23.12.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 61 528.4 23. Dezember 2002 (23.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): FRIZ BIOCHEM GMBH [DE/DE]; Staffelseestr. 6,
81477 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HARTWICH, Ger-
hard [DE/DE]; Nibelungenstr. 10, 80639 München (DE).
LOSSAU, Harald [DE/DE]; Preysingstrasse 20, 81667
München (DE). WIEDER, Herbert [DE/DE]; Partnachstr.

3, 81373 München (DE). PERSIKE, Norbert [DE/DE];
Hanselmannstr. 15, 80809 München (DE). MUSEWALD,
Christian [DE/DE]; Huber am Ort 5, 84513 Töging am
Inn (DE).

(74) Anwalt: GRAPE & SCHWARZENSTEINER; Sebas-
tiansplatz 7, 80331 München (DE).

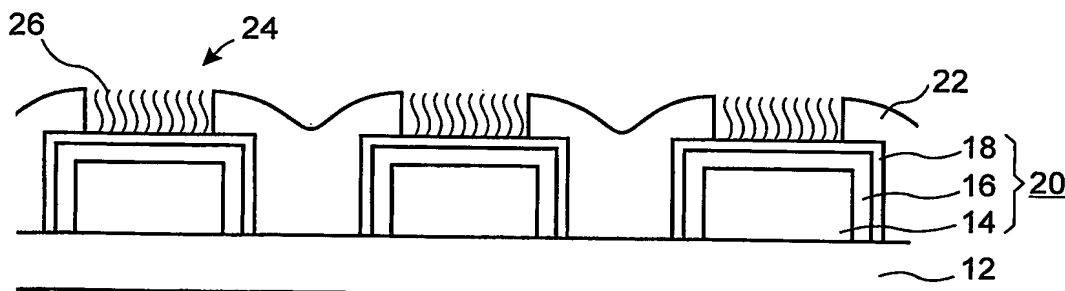
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO Patent (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: ELECTRICAL SUBSTRATE FOR USE AS A CARRIER OF BIOMOLECULES

(54) Bezeichnung: ELEKTRISCHES SUBSTRAT ZUM EINSATZ ALS TRÄGER VON BIOMOLEKÜLEN



(57) Abstract: The invention relates to an electrical substrate for use as a carrier of biomolecules in a method for electrochemical detection in an electrolytic solution. Said substrate comprises an insulating carrier plate (12) with a conductive pattern (20; 20A-20C) containing printed conductors (20; 20A-20C) and connection contact surfaces. The printed conductors (20; 20A-20C) are equipped with test sites (24) for the application of biomolecules (26), comprise a metal core (14) consisting of a highly conductive base metal and an external gold layer (18) and are provided with a diffusion barrier layer (16), which prevents direct contact between the electrolytic solution and the metal core (14) during the electrochemical detection method.

(57) Zusammenfassung: Ein elektrisches Substrat zum Einsatz als Träger von Biomolekülen bei einem Verfahren zur elektrochemischen Detektion in einer Elektrolytlösung weist eine isolierende Trägerplatte (12) auf, die ein Leiterbild (20; 20A-20C, 28) mit Leiterbahnen (20; 20A-20C) und Anschlusskontaktflächen trägt, und auf den Leiterbahnen (20; 20A-20C) angeordneten Teststellen (24) zum Aufbringen von Biomolekülen (26), wobei die Leiterbahnen (20; 20A-20C) einen Metallkern (14) aus einem gut leitenden Unedelmetall und eine äußere Goldschicht (18) aufweisen und wobei die Leiterbahnen (20; 20A-20C) mit einer Diffusions-sperrschicht (16) versehen sind, die bei dem elektrochemischen Detektionsverfahren einen direkten Kontakt der Elektrolytlösung mit dem Metallkern (14) verhindert.

WO 2004/059305 A2



Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Elektrisches Substrat zum Einsatz als Träger von Biomolekülen

5

Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft ein elektrisches Substrat zum Einsatz als Träger von Biomolekülen bei einem Verfahren zur elektrochemischen Detektion in einer Elektrolytlösung. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines derartigen Substrats in einem elektrochemischen Verfahren zum Nachweis von Biomolekülen.

15

Stand der Technik

Die Detektion von in Elektrolytlösung enthaltenen Substanzen ist beispielsweise in der DE 199 56 729 C1 beschrieben. Bei dem unter dem Namen "High Pressure Liquid Chromatography" (HPLC) bekannten Verfahren wird eine Suchsubstanz einer Trägerflüssigkeit zugegeben und die entstehende Elektrolytlösung über eine Trennsäule geleitet. Die Trennsäule weist hinsichtlich verschiedener Suchsubstanzen eine unterschiedlich starke Rückhaltwirkung auf, so dass die verschiedenen Substanzen am Ausgang der Säule zeitlich versetzt auftreten und einzeln analysiert werden können.

25

Zur Analyse ist hinter der Trennsäule eine Messzelle mit einer Durchlasskammer angeordnet, in die eine Arbeitselektrode und eine Gegenelektrode ragen, die von der Elektrolytlösung überströmt werden. Zum Nachweis einer Suchsubstanz wird zwischen Arbeitselektrode und Gegenelektrode ein Potential angelegt, das die Suchsubstanz oxidiert oder reduziert. Der Elektronenfluss wird als Stromfluss an der Arbeitselektrode gemessen und ist ein Maß für den

30

Gehalt der Suchsubstanz in der Probe.

- Neben derartigen seriellen Verfahren finden zunehmend parallele Detektionsverfahren mittels Array-Technologie unter Verwendung so genannter DNA- oder Protein-Chips Anwendung. Dabei wird etwa zur Genanalyse auf einem Chip auf einer Oberfläche eine Bibliothek bekannter DNA-Sequenzen, der Sonden-Oligonukleotide, in einem geordneten Raster fixiert, so dass die Position jeder individuellen DNA-Sequenz bekannt ist. Existieren in der Untersuchungslösung Fragmente aktiver Gene, der Target-Oligonukleotide, deren Sequenzen zu bestimmten Sonden-Oligonukleotiden auf dem Chip komplementär sind, so können die Target-Oligonukleotide durch Nachweis der entsprechenden Hybridisierungsereignisse auf dem Chip identifiziert und ausgelesen werden.
- Die bekannte Verwendung radioaktiver Markierungen bei der DNA-/RNA-Sequenzierung weist eine Reihe von Nachteilen auf, wie etwa die aufwendigen Sicherheitsvorkehrungen beim Umgang mit radioaktiven Materialien. Bei den bekannten Verfahren mit fluoreszenz- oder massenspektrometrischer Detektion sind die Kosten der apparativen Ausstattung sehr hoch.
- Um diesen Nachteilen zu begegnen, ist vorgeschlagen worden, die Assoziationsereignisse anhand der mit der Assoziation einhergehenden Änderung der elektrochemischen Eigenschaften der Sonden-Oligonukleotide nachzuweisen, vgl. etwa WO 97/46568, WO 99/51778, WO 00/31101 oder WO 00/42217.

Darstellung der Erfindung

- Hier setzt die Erfindung an. Der Erfindung, wie sie in den Ansprüchen gekennzeichnet ist, liegt die Aufgabe zugrunde, die Nachweisgenauigkeit eines elektrochemischen Detektionsverfahrens der eingangs genannten Art zu erhöhen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch das elektrische Substrat nach Anspruch 1 und die Verwendung nach Anspruch 26 gelöst. Weitere vorteilhafte Details, Aspekte und Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung, den Figuren und den Beispielen.

Das erfindungsgemäße elektrische Substrat enthält eine isolierende Trägerplatte, die ein Leiterbild mit Leiterbahnen und Anschlusskontaktflächen trägt, sowie auf den Leiterbahnen angeordneten Teststellen zum Aufbringen von Biomolekülen. Dabei weisen die Leiterbahnen einen Metallkern aus einem gut leitenden Unedelmetall und eine den Metallkern umgebende Goldschicht auf. Die Leiterbahnen sind weiter durchgehend mit einer Diffusionssperrschicht versehen, die bei der Durchführung eines elektrochemischen Detektionsverfahrens einen direkten Kontakt der Elektrolytlösung mit dem Metallkern verhindert.

Die Erfindung beruht dabei auf der Erkenntnis der gegenwärtigen Erfinder, dass der auf elektrischen Substraten vorgesehene Unedelmetallkern, typischerweise Kupfer, das Messsignal bei der elektrochemischen Detektion stark beeinflussen kann. So führt beispielsweise die Kupferoxidation zu einem Signalpeak bei einem Potential von 250 mV relativ zu einer Ag/AgCl Referenzelektrode. In diesem Potentialbereich werden auch viele der als bevorzugt angegebenen elektrochemischen Nachweisverfahren durchgeführt. Insbesondere wenn sehr kleine Mengen einer Testsubstanz nachgewiesen werden sollen, kann schon eine vergleichsweise kleine Anzahl an Kupferatomen zu einer Verfälschung oder unerwünschten Beeinflussung des Messsignals führen.

Versuche der Erfinder haben nun ergeben, dass einfachere Maßnahmen nicht ausreichen, um den Störeinfluss des Unedelmetallkerns auf das erforderliche geringe Maß zu reduzieren. Beispielsweise hat es sich als ungenügend herausgestellt, zunächst auf eine auf der Trägerplatte aufgebraute Kupferfolie

großflächig eine Nickel-Sperrschicht und eine Goldschicht aufzubringen und diese Schichtstruktur in ein Leiterbild zu strukturieren, da dabei keine durchgehende Diffusionssperrschicht entsteht. Kupferatome treten bei dieser Vorgehensweise über die nicht genügend geschützten Seitenflächen der Leiterbahnen in Kontakt mit der Elektrolytlösung.

Die elektrochemische Detektion bietet außerdem eine Reihe weiterer Vorteile, die erst zum Tragen kommen, wenn der störende, elektrochemische Einfluss des Unedelmetalls durch die Diffusionssperrschicht reduziert oder vollständig eliminiert wird. Dazu zählt etwa die wesentlich höhere Sensitivität des elektrochemischen Ausleseverfahrens gegenüber den herkömmlichen Verfahren durch die direkte Anbindung der Fängermoleküle an die nachfolgende Elektronik. Dadurch kann auch die erforderliche Auswertezeit stark reduziert werden. Auch die vergleichsweise einfache Präparation führt zu einer Verkürzung des insgesamt für eine Messung benötigten Zeitbedarfs. Die zu untersuchende Substanz muss, anderes als bei herkömmlichen Verfahren, nicht durch einen speziellen Marker modifiziert werden, oder durch fehlerbehaftete Amplifikationen (multiplikative Verfahren) auf eine detektierbare Stoffmenge gebracht werden.

Nach einer bevorzugten Ausgestaltung umfasst der Metallkern des erfindungsgemäßen Substrats Kupfer, Wolfram und/oder Aluminium. Insbesondere kann der Metallkern mit Vorteil aus Kupfer gebildet sein.

In einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung umfasst die Diffusionssperrschicht eine zwischen dem Metallkern und der äußeren Goldschicht angeordnete Zwischenschicht aus Nickel, Titan und/oder Platin. Eine derartige Zwischenschicht verhindert wirkungsvoll die Diffusion von Atomen aus dem Unedelmetallkern in die Elektrolytlösung und ermöglicht damit höchstempfindliche elektrochemische Nachweisverfahren.

- 5 -

Die Zwischenschicht weist zweckmäßig eine Dicke von etwa 2 μm bis etwa 10 μm , bevorzugt von etwa 3 μm bis etwa 8 μm , besonders bevorzugt von etwa 4 μm bis etwa 6 μm auf.

- 5 Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung umfasst die Diffusionssperrschicht eine auf die Goldschicht aufgebrachte Lackschicht.

Es kann ebenfalls vorgesehen sein, dass die Diffusionssperrschicht eine auf dem Metallkern angeordnete Goldschicht umfasst, deren Poren durch An-
10 schmelzen eines Oberflächenbereichs der Goldschicht im Wesentlichen verschlossen sind, so dass die Migration von Atomen aus dem Metallkern praktisch unterbunden ist.

Es versteht sich, dass die Diffusionssperrschicht auch durch eine Kombination
15 mehrerer der geschilderten Maßnahmen gebildet werden kann. Beispielsweise kann die Diffusionssperrschicht nur in Teilbereichen durch eine auf die Goldschicht aufgebrachte Lackschicht gebildet sein. In Bereichen ohne aufgebrachte Lackschicht, wie etwa den Teststellen, kann die Goldschicht durch Laserbeschuss angeschmolzen werden, so dass die Goldschicht in diesen
20 Bereichen selbst eine Diffusionssperrschicht bildet.

Als besonders vorteilhaft hat es sich herausgestellt, wenn die Goldschicht in den genannten Ausgestaltungen eine Dicke von etwa 0,15 μm bis etwa 10 μm aufweist, bevorzugt von etwa 1 μm bis etwa 5 μm , besonders bevorzugt von
25 etwa 2 μm bis etwa 3 μm .

In einer anderen Ausgestaltung der Erfindung ist die Diffusionssperrschicht durch eine auf dem Metallkern angeordnete Goldschicht gebildet, deren Dicke
so groß gewählt ist, dass sie einen direkten Kontakt der Elektrolytlösung mit
30 dem Metallkern verhindert.

Die isolierende Trägerplatte ist zweckmäßig eine einseitige starre Trägerplatte, eine doppelseitige starre Trägerplatte oder eine starre Mehrlagenträgerplatte. Alternativ kann die isolierende Trägerplatte eine einseitige oder doppelseitige flexible Trägerplatte, insbesondere aus einer Polyimidfolie, oder eine starrflexible Trägerplatte sein. Sie besteht mit Vorteil aus einem Basismaterial, das ausgewählt ist aus der Gruppe BT (Bismaleinimid-Triazinharz mit Quarzglas), CE (Cyanatester mit Quarzglas), CEM1 (Hartpapierkern mit FR4-Außenlagen), CEM3 (Glasvlieskern mit FR4-Außenlagen), FR2 (Phenolharzpapier), FR3 (Hartpapier), FR4 (Epoxid-Glashartgewebe), FR5 (Epoxid-Glashartgewebe mit vernetztem Harzsystem), PD (Polyimidharz mit Aramidverstärkung), PTFE (Polytetrafluoräthylen mit Glas oder Keramik), CHn (Hochvernetzte Kohlenwasserstoffe mit Keramik) und Glas.

Nach einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die isolierende Trägerplatte durch eine Halbleiterplatte oder eine mit einer Trägerplatten-Isolationsschicht versehene Halbleiterplatte gebildet. Beispielsweise kann die isolierende Trägerplatte des elektrischen Substrats mit Vorteil durch eine mit einer SiNx-Isolationsschicht versehene Siliziumplatte gebildet sein.

Die Leiterbahnen des elektrischen Substrats weisen in einer bevorzugten Ausgestaltung der Erfindung eine Breite von 50 µm bis 250 µm, insbesondere von 80 µm bis 200 µm auf.

Sind die Leiterbahnen auf einem Halbleitersubstrat, wie etwa der erwähnten SiNx-beschichteten Si-Platte gebildet, können sie entsprechend den herkömmlichen Prozessen der Halbleitertechnologie auch erheblich schmaler ausgebildet sein und eine Breite von wenigen µm oder auch unterhalb eines Mikrometers aufweisen. Werden die Leiterbahnen sehr schmal ausgebildet, so weisen sie mit Vorteil im Bereich der Teststellen Verbreiterungen auf, um eine ausreichend große Fläche für die Aufnahme von Biomolekülen zur Verfügung zu stellen.

- 7 -

Weiterhin kann erfindungsgemäß mit Vorteil vorgesehen sein, dass auf die äußere Goldschicht in Teilbereichen eine Isolationsschicht aufgebracht ist. Insbesondere kann die Isolationsschicht mit Vorteil durch einen thermisch und/oder optisch härtbaren, strukturierbaren Lack gebildet sein. In einer
5 zweckmäßigen Ausführungsform ist die Isolationsschicht durch eine Parylen-Schicht gebildet.

Nach der Erfindung weist die Isolationsschicht bevorzugt eine Dicke von etwa 1 µm bis etwa 30 µm, besonders bevorzugt von etwa 5 µm bis etwa 20 µm
10 auf. Die Isolationsschicht weist zweckmäßig auf einem Teil der Leiterbahnen bis zur darunter liegenden Goldschicht reichende Aussparungen auf, die Teststellen zum Aufbringen der Biomoleküle bilden.

Gemäß einer vorteilhaften Weiterbildung der Erfindung enthält das Leiterbild
15 eine oder mehrere Durchkontaktierungen, die einen an ihrer umlaufenden Randfläche angeordneten Metallkern aus einem gut leitenden Unedelmetall und eine den Metallkern umgebende Goldschicht aufweisen. Die Durchkontaktierungen sind durchgehend mit einer Diffusionssperrschicht versehen, die bei dem elektrochemischen Detektionsverfahren einen direkten Kontakt der Elekt-
20 rolytlösung mit dem Metallkern verhindert.

In dieser Ausführungsform ist der Metallkern der Durchkontaktierungen bevorzugt aus Wolfram oder Aluminium gebildet. Die Diffusionssperrschicht ist zweckmäßig durch eine zwischen dem Metallkern der Durchkontaktierungen
25 und der äußeren Goldschicht angeordnete Zwischenschicht aus Nickel, Titan und/oder Platin gebildet.

Die Dicke der Zwischenschicht der Durchkontaktierungen beträgt vorteilhaft etwa 0,01 µm bis etwa 1 µm, bevorzugt etwa 0,05 µm bis etwa 0,5 µm, be-
30 sondern bevorzugt etwa 0,1 µm bis etwa 0,2 µm. Die Goldschicht der Durchkontaktierungen weist mit Vorteil eine Dicke von etwa 0,05 µm bis etwa 0,75

- 8 -

μm , bevorzugt von etwa 0,15 μm bis etwa 0,5 μm , besonders bevorzugt von etwa 0,3 μm auf.

Die Erfindung umfasst auch die Verwendung eines elektrischen Substrats der
5 beschriebenen Art in einem elektrochemischen Nachweisverfahren ausge-
wählt aus der Gruppe Chronoamperometrie (CA), Chronocoulometrie (CC),
Linear Sweep Voltammetrie (LSV), zyklische Voltammetrie (CSV), AC Vol-
tammetrie, Voltammetrietechniken mit verschiedenen Pulsformen, insbeson-
dere Square Wave Voltammetrie (SWV), Differential Pulse Voltammetrie
10 (DPV), oder Normal Pulse Voltammetrie (NPV), AC oder DC Impedanzspekt-
roskopie, Chronopotentiometrie und zyklische Chronopotentiometrie.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungen, Merkmale und Details der Erfindung
ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen, der Beschreibung des Ausführ-
15 rungsbeispiels und den Zeichnungen.

Kurze Beschreibung der Zeichnung

20 Nachfolgend soll die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen im Zu-
sammenhang mit den Zeichnungen näher erläutert werden. Dabei sind nur die
für das Verständnis der Erfindung wesentlichen Elemente dargestellt. Es zeigt

Figur 1 einen Ausschnitt aus einem elektrischen Substrat nach einem
25 Ausführungsbeispiel der Erfindung in schematischer Darstellung;

Figur 2 einen Schnitt durch das elektrische Substrat von Fig. 1 entlang der
Linie A-A; und

30 Figur 3 einen Schnitt wie in Fig. 2 durch ein elektrisches Substrat nach
einem anderen Ausführungsbeispiel der Erfindung.

Wege zur Ausführung der Erfindung

5 Mit Bezug auf die schematischen Darstellungen der Figuren 1 und 2 bezeichnet 10 ein elektrisches Substrat, das als Träger von Biomolekülen bei einem Verfahren zur elektrochemischen Detektion in einer Elektrolytlösung zum Einsatz kommt, wie es beispielsweise in der Druckschrift WO 00/42217 beschrieben ist.

10

Das elektrische Substrat 10 umfasst eine isolierende Trägerplatte 12 aus dem Epoxid-Glashartgewebe FR4, auf der ein Leiterbild mit einer Mehrzahl, im Ausführungsbeispiel fünfzig, paralleler Leiterbahnen angeordnet ist. Von der Mehrzahl der Leiterbahnen sind in dem Ausschnitt der Fig. 1 lediglich ein Teil der Gegenelektrode 28 und drei von achtundvierzig parallelen Arbeitselektro-

15

den dargestellt, die mit 20A bis 20C bezeichnet sind. Die achtundvierzig parallelen Arbeitselektroden weisen, wie beispielhaft für die Arbeitselektroden 20A bis 20C gezeigt, jeweils eine im Wesentlichen rechteckige Teststelle 24 auf, auf der für die Durchführung eines elektrochemischen Nachweisverfahrens

20

Biomoleküle 26 aufgebracht sind.

Figur 2 zeigt einen Schnitt entlang der Linie A-A von Fig. 1 durch die Leiterbahnen 20A bis 20C. Jede der Leiterbahnen 20 besteht aus einem Kupferkern 14, der durchgehend von einer Nickel-Sperrschicht 16 und einer Goldschicht 18 überzogen ist. Im Ausführungsbeispiel hat der Kupferkern 14 eine Dicke von etwa 28 µm. Er stellt einen preiswerten und gut leitfähigen Grundbestandteil der Leiterbahnen 20 dar.

25

Um hochgenaue Messungen bei der elektrochemischen Detektion im wässrigen Medium zu ermöglichen, sind die Kupferkerne 14 durchgehend mit der etwa 2 µm dicken Goldschicht 18 überzogen. Zwischen dem Kupferkern 14

30

und der Goldschicht 18 ist als Diffusionssperre jeweils eine etwa 6 µm dicke, durchgehende Nickelschicht 16 angeordnet.

5 Das gesamte Leiterbild ist mit einer 15 µm bis 20 µm dicken Isolationsschicht 22, im Ausführungsbeispiel aus einem strukturierbaren, optisch aushärtbaren Lack überzogen. In diese Isolationsschicht 22 sind rechteckige Ausnehmungen 24 eingebracht, beispielsweise durch Laser-Beschuss der Isolations-

10 schicht 22 mit hochenergetischen Pulsen eines Excimer-Lasers. Die Ausnehmungen 24 bilden die Teststellen zur Aufnahme der Biomoleküle 26.

Die Leiterbahnen 20 des Ausführungsbeispiels der Figuren 1 und 2 sind etwa 100 µm breit und mit einem Abstand von etwa 200 µm (Mitte-Mitte) auf der Trägerplatte 12 angeordnet. Die quadratischen Teststellen 24 weisen eine Ausdehnung von etwa 60 µm x 60 µm auf. Die Arbeitselektroden 20A-20C, die

15 Gegenelektrode 28 und eine gegebenenfalls ebenfalls vorgesehene Referenzelektrode sind zur Kontaktierung jeweils mit nicht dargestellten Anschlusskontaktflächen des elektrischen Substrats 10 verbunden.

Zur Durchführung einer elektrochemischen Detektion werden beispielsweise

20 bei der Chronocoulometrie Ladungs-Zeitkurven aufgezeichnet, wie in der Druckschrift WO 00/42217 im Detail beschrieben. Die Teststellen 24 der acht- undvierzig Arbeitselektroden 20A, 20B, 20C, ..., sind dazu selektiv mit Son-

den-Biomolekülen, beispielsweise 20-Nukleotid-Ligat-Oligonukleotiden belegt. Die Teststellen 24 werden dann mit einer Signal-Oligonukleotidlösung, bei-

25 spielsweise einem 12-Nukleotid- Signal-Nukleinsäureoligomer-Liganden in Kontakt gebracht und nach einer vorbestimmten Inkubationsdauer gemessen. Die Signal-Nukleinsäureoligomer-Liganden tragen dabei ein oder mehrere Redoxlabel und sind zu einem oberflächennahen Bereich des Ligat-

30 Oligonukleotids komplementär, so dass eine Assoziation zwischen Ligat-Oligonukleotid und redox-markiertem Signal-Nukleinsäureoligomer-Komplexbildner stattfinden kann.

Dann werden die Arbeitselektroden einzeln oder in Gruppen mittels eines Potentiostaten auf ein erstes Potential gesetzt, bei dem wenig bis gar keine Elektrolyse (elektrochemische Änderung des Redoxzustands) der Redoxmarkierung stattfinden kann. Beispielsweise wird die Arbeitselektrode bei Ferrocen-

5 modifizierten Ligat-Oligonukleotiden jeweils auf ein Potential von etwa 100 mV gegenüber der Referenzelektrode, im Ausführungsbeispiel (Ag/AgCl (KCl)), gesetzt.

Anschließend wird oder werden die Arbeitselektrode(n) durch einen Potential-

10 sprung auf ein zweites höheres Potential gesetzt, bei dem die Elektrolyse der Redoxmarkierung im diffusionslimitierten Grenzfall stattfindet. Bei Ferrocen-modifizierten ss-Nukleinsäureoligomer-Komplexbildner wird die Arbeitselektrode dabei auf etwa 500 mV gegen Ag/AgCl (KCl) gesetzt. Die transferierten Ladungen werden als Messsignal in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet.

15 Dieses Messsignal der Chronocoulometrie, die transferierte Ladung Q in Abhängigkeit von der Zeit t , setzt sich aus drei Komponenten zusammen: einem diffusiven Anteil, der durch die gelösten redoxaktiven Komponenten in der Volumenphase hervorgerufen wird und eine $t^{1/2}$ -Abhängigkeit aufweist, einem

20 ersten instantanen Anteil, der aus der Ladungsumverteilung in der Doppelschicht an der Elektrodenoberfläche resultiert und einem zweiten instantanen Anteil, der durch die Umsetzung redoxaktiver Komponenten bedingt ist, die an der Elektrodenoberfläche immobilisiert sind.

25 Nach der ersten Messung wird die Probenlösung zugegeben, die das Ligand-Nukleinsäureoligomer (Target) enthalten soll bzw. kann, welches eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in einem Bereich zu dem 20-Nukleotid der Ligat-Oligonukleotide komplementär ist. Nach Hybridisierung des Targets an die Ligat-Oligonukleotide und somit nach partieller Verdrängung der Signal-

30 Nukleinsäureoligomer-Liganden wird eine zweite elektrochemische Messung durchgeführt. Die Änderung des instantanen Ladungssignals ist proportional zur Anzahl der verdrängten Signal-Oligonukleotid-Liganden und ist somit pro-

portional zur Anzahl der in der Untersuchungslösung vorhandenen Target-Oligonukleotide.

Ein Schnitt durch ein elektrisches Substrat 10 nach einem anderen Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der Fig. 3 dargestellt. Wie bei dem Ausführungsbeispiel der Fig. 2 enthält jede der Leiterbahnen 20 einen Kupferkern 14. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen Ausführungsform wurde der Kupferkern 14 jedoch direkt mit einer etwa 7 µm dicken Goldschicht 18 beschichtet und das Leiterbild ist mit einer 15 µm dicken Parylen-Lackschicht 22 überzogen.

Um Teststellen 24 zu definieren, ist in die Lackschicht 22 durch Excimer-Laserbeschuss für jede Leiterbahn 20 eine Ausnehmung eingebracht. Laserenergie und Anzahl der Laserpulse sind dabei so gewählt, dass nach der Entfernung der Lackschicht 22 die unter der Lackschicht liegende Goldschicht 18 in einer Oberflächenregion 26 anschnilt. Dadurch werden die Oberflächenporen der Goldschicht 18 im Bereich der Teststellen 24 verschlossen, so dass die Goldschicht 18 dort eine für diffundierende Kupferatome undurchlässige Sperrschicht bildet. In den anderen Bereichen verhindert die Lackschicht 22 einen Kontakt der Kupferatome mit der Elektrolytlösung.

Bei einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung enthält jede Leiterbahn 20 einen etwa 2 µm dicken Metallkern aus Wolfram. Der Wolframkern ist dabei durchgehend mit einer Diffusionssperrschicht überzogen, die aus jeweils 2 µm dicken Schichten aus Titan und Platin gebildet ist. Auf diese Diffusionssperrschicht ist durchgehend eine etwa 2 µm dicke Goldschicht aufgebracht, auf der in der oben beschriebenen Weise eine Reihe von Teststellen zur Aufnahme von Biomolekülen definiert ist. Auch ein derart gestaltetes elektrisches Substrat erlaubt die Durchführung hochempfindlicher elektrochemischer Nachweisverfahren.

- Gemäß noch einem weiteren Ausführungsbeispiel der Erfindung enthält eine mit SiN_x beschichtete Silizium-Trägerplatte eine Mehrzahl von kreisförmigen Durchkontaktierungen, bei denen ein am Rand der Durchkontaktierungen umlaufender Wolfram-Kern mit einer etwa $0,1\ \mu\text{m}$ dicken Titan- und einer etwa
- 5 $0,1\ \mu\text{m}$ dicken Platinschicht überzogen ist. Auf diese so gebildete Sperrschicht ist eine $0,3\ \mu\text{m}$ dicke Goldschicht aufgebracht. Dadurch wird ein für hochempfindliche elektrochemische Nachweisverfahren geeignetes elektrisches Halbleitersubstrat geschaffen.
- 10 Während die Erfindung insbesondere mit Bezug auf bevorzugte Ausführungsbeispiele gezeigt und beschrieben worden ist, versteht sich für den Fachmann, dass Änderungen in Gestalt und Einzelheiten gemacht werden können, ohne von dem Gedanken und Umfang der Erfindung abzuweichen. Beispielsweise kann anstelle des Wolfram-Kerns der Durchkontaktierungen auch ein Alumi-
- 15 um-Kern verwendet werden. Auch kann die Trägerplatten-Isolationsschicht anstelle von Siliziumnitrid auch aus Siliziumoxid oder Oxynitridmischungen gebildet sein. Dementsprechend soll die Offenbarung der vorliegenden Erfindung nicht einschränkend sein. Statt dessen soll die Offenbarung der vorliegenden Erfindung den Umfang der Erfindung veranschaulichen, der in den
- 20 nachfolgenden Ansprüchen dargelegt ist.

Patentansprüche

- 5 1. Elektrisches Substrat zum Einsatz als Träger von Biomolekülen bei einem Verfahren zur elektrochemischen Detektion in einer Elektrolytlösung, mit einer isolierenden Trägerplatte (12), die ein Leiterbild (20; 20A-20C, 28) mit Leiterbahnen (20; 20A-20C) und Anschlusskontaktflächen trägt, und mit
10 auf den Leiterbahnen (20; 20A-20C) angeordneten Teststellen (24) zum Aufbringen von Biomolekülen (26),
wobei die Leiterbahnen (20; 20A-20C) einen Metallkern (14) aus einem gut leitenden Unedelmetall und eine den Metallkern umgebende Goldschicht (18) aufweisen, und wobei die Leiterbahnen (20; 20A-20C) durchgehend
15 mit einer Diffusionssperrschicht (16) versehen sind, die bei dem elektrochemischen Detektionsverfahren einen direkten Kontakt der Elektrolytlösung mit dem Metallkern (14) verhindert.
2. Elektrisches Substrat nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet, dass
20 der Metallkern (14) Kupfer, Wolfram und/oder Aluminium umfasst.
3. Elektrisches Substrat nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, dass
25 der Metallkern (14) aus Kupfer gebildet ist.
4. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Diffusionssperrschicht eine zwischen dem Metallkern (14) und der äußeren Goldschicht (18) angeordnete Zwischenschicht (16) aus Nickel, Titan
30 und/oder Platin umfasst.

- 15 -

5. Elektrisches Substrat nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Zwischenschicht (16) eine Dicke von etwa 2 μm bis etwa 10 μm , bevor-
zugt von etwa 3 μm bis etwa 8 μm , besonders bevorzugt von etwa 4 μm bis
5 etwa 6 μm aufweist.
6. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Diffusionssperrschicht eine auf die Goldschicht (18) aufgebrachte Lack-
10 schicht umfasst.
7. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Diffusionssperrschicht eine auf dem Metallkern angeordnete Gold-
15 schicht (18) umfasst, deren Poren durch Anschmelzen eines Oberflächen-
bereichs (26) der Goldschicht (18) im Wesentlichen verschlossen sind.
8. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
20 die Goldschicht (18) eine Dicke von etwa 0,15 μm bis etwa 10 μm , bevor-
zugt von etwa 1 μm bis etwa 5 μm , besonders bevorzugt von etwa 2 μm bis
etwa 3 μm aufweist.
9. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
25 dadurch gekennzeichnet, dass
die Diffusionssperrschicht durch eine auf dem Metallkern angeordnete
Goldschicht gebildet wird, deren Dicke so groß gewählt ist, dass sie einen
direkten Kontakt der Elektrolytlösung mit dem Metallkern (14) verhindert.

10. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierende Trägerplatte (12) eine einseitige starre Trägerplatte, eine
doppelseitige starre Trägerplatte oder eine starre Mehrlagenträgerplatte ist.

5

11. Elektrisches Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierende Trägerplatte (12) eine einseitige oder doppelseitige flexible
Trägerplatte, insbesondere aus einer Polyimidfolie, oder eine starrflexible
Trägerplatte ist.

10

12. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierende Trägerplatte (12) aus einem Basismaterial besteht, das
ausgewählt ist aus der Gruppe Bismaleinimid-Triazinharz mit Quarzglas
(BT), Cyanatester mit Quarzglas (CE), Hartpapierkern mit FR4-Außenlagen
(CEM1), Glasvlieskern mit FR4-Außenlagen (CEM3), Phenolharzpapier
(FR2), Hartpapier (FR3), Epoxid-Glashartgewebe (FR4), Epoxid-
Glashartgewebe mit vernetztem Harzsystem (FR5), Polyimidharz mit Ara-
midverstärkung (PD), Polytetrafluoräthylen mit Glas oder Keramik (PTFE),
Hochvernetzte Kohlenwasserstoffe mit Keramik (CHn) und Glas.

15

20

13. Elektrisches Substrat nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierende Trägerplatte (12) durch eine Halbleiterplatte oder eine mit
einer Trägerplatten-Isolationsschicht versehene Halbleiterplatte gebildet ist.

25

14. Elektrisches Substrat nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet, dass
die isolierende Trägerplatte (12) durch eine mit einer SiN_x -
Isolationsschicht versehene Siliziumplatte gebildet ist.

30

15. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Leiterbahnen (20) eine Breite von 50 μm bis 250 μm , insbesondere von
80 μm bis 200 μm aufweisen.

5

16. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
auf die Goldschicht (18) in Teilbereichen eine Isolationsschicht (22) aufge-
bracht ist.

10

17. Elektrisches Substrat nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Isolationsschicht (22) durch einen thermisch und/oder optisch härtba-
ren, strukturierbaren Lack gebildet ist.

15

18. Elektrisches Substrat nach Anspruch 16 oder 17,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Isolationsschicht (22) durch eine Parylen-Schicht gebildet ist.

20 19. Elektrisches Substrat nach einem der Ansprüche 16 bis 18,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Isolationsschicht (22) eine Dicke von etwa 1 μm bis etwa 30 μm , bevor-
zugt von etwa 5 μm bis etwa 20 μm aufweist.

25 20. Elektrisches Substrat nach einem der Ansprüche 16 bis 19,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Isolationsschicht (22) auf einem Teil der Leiterbahnen (20) bis zur dar-
unter liegenden Goldschicht (18) reichende Aussparungen (24) aufweist,
die Teststellen zum Aufbringen der Biomoleküle (26) bilden.

30

21. Elektrisches Substrat nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet, dass
das Leiterbild eine oder mehrere Durchkontaktierungen enthält, die einen
an ihrer umlaufenden Randfläche angeordneten Metallkern aus einem gut
5 leitenden Unedelmetall und eine den Metallkern umgebende Goldschicht
aufweisen, und wobei die Durchkontaktierungen durchgehend mit einer Dif-
fusionssperrschicht versehen sind, die bei dem elektrochemischen Detekti-
onsverfahren einen direkten Kontakt der Elektrolytlösung mit dem Metall-
kern verhindert.

10 22. Elektrisches Substrat nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet, dass
der Metallkern der Durchkontaktierungen aus Wolfram oder Aluminium ge-
bildet ist.

15 23. Elektrisches Substrat nach einem der Ansprüche 21 oder 22,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Diffusionssperrschicht durch eine zwischen dem Metallkern der Durch-
kontaktierungen und der äußeren Goldschicht angeordnete Zwischen-
20 schicht aus Nickel, Titan und/oder Platin gebildet ist.

24. Elektrisches Substrat nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet, dass
die Zwischenschicht der Durchkontaktierungen eine Dicke von etwa 0,01
25 μm bis etwa 1 μm , bevorzugt von etwa 0,05 μm bis etwa 0,5 μm , beson-
ders bevorzugt von etwa 0,1 μm bis etwa 0,2 μm aufweist.

25. Elektrisches Substrat nach einem der Ansprüche 21 bis 24,
dadurch gekennzeichnet, dass
30 die Goldschicht der Durchkontaktierungen eine Dicke von etwa 0,05 μm bis
etwa 0,75 μm , bevorzugt von etwa 0,15 μm bis etwa 0,5 μm , besonders
bevorzugt von etwa 0,3 μm aufweist.

26. Verwendung eines elektrischen Substrats nach einem der vorhergehenden Ansprüche in einem elektrochemischen Nachweisverfahren ausgewählt aus der Gruppe Chronoamperometrie (CA), Chronocoulometrie (CC), Linear Sweep Voltammetrie (LSV), zyklische Voltammetrie (CSV), AC Voltammetrie, Voltammetrietechniken mit verschiedenen Pulsformen, insbesondere Square Wave Voltammetrie (SWV), Differential Pulse Voltammetrie (DPV), oder Normal Pulse Voltammetrie (NPV), AC oder DC Impedanzspektroskopie, Chronopotentiometrie und zyklische Chronopotentiometrie.

10

1/1

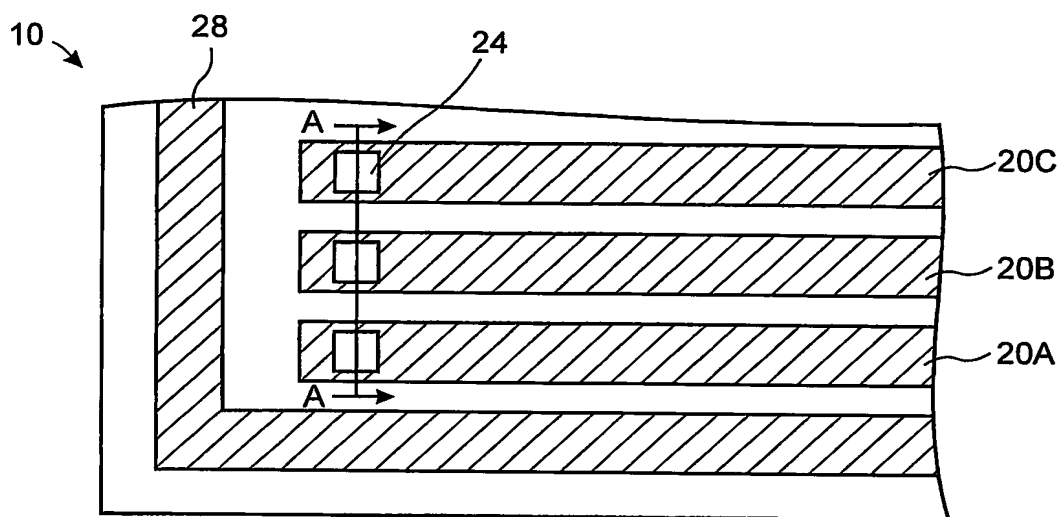


Fig. 1

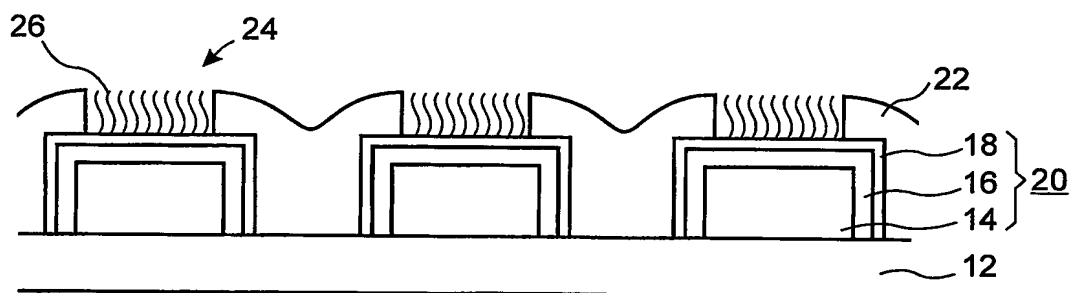


Fig. 2

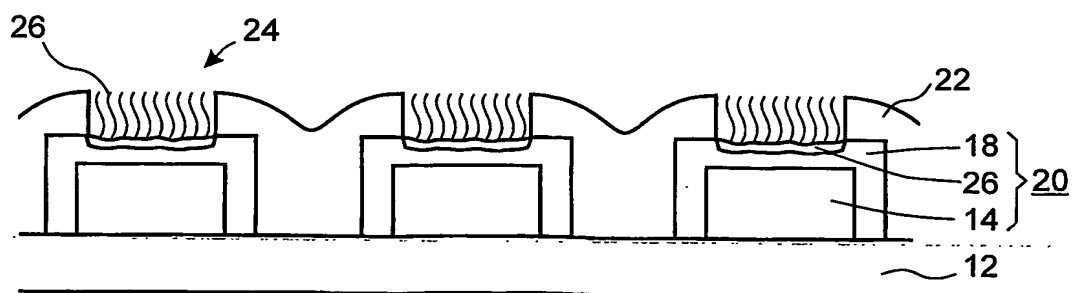


Fig. 3